

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 18 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293253

研究課題名(和文) 難治性脳形成障害胎児脳より樹立した神経幹細胞を用いた分子病態解析と治療法の探索

研究課題名(英文) Mechanisms of brain malformations: in vitro analysis using patient-derived neural stem cells

研究代表者

伏木 信次 (Fushiki, Shinji)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任教授

研究者番号：80150572

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト脳形成異常の病態解明のために、タナトフォリック骨異形成症(TD)に着目し、疾患由来培養神経幹細胞(NSCs)を駆使したin vitroオルガノイド培養法を確立し、分子病態解析を展開した。未分化状態のNSCs増殖能は、正常とTDで有意差はなかったが、2次元分散培養では、正常と比較してTDでグリア細胞の増生が顕著に亢進していた。NSCsからオルガノイドを作製し表現型を比較検討した結果、オルガノイド表層領域での神経細胞とグリア細胞の細胞数および分布に差異を見出した。遺伝子発現データ解析において、受容体型チロシンキナーゼ経路関連遺伝子群が、TDオルガノイド病態と関連することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We generated novel in vitro cerebral organoids from human-derived neural stem cells (NSCs) in order to clarify the underlying pathomechanisms of brain malformation. Comparative studies on proliferation, cellular migration, and differentiation using control-derived NSCs and thanatophoric dysplasia (TD)-derived NSCs were conducted. Although proliferation potency was similar in undifferentiated conditions, GFAP and phosphorylated STAT1 were significantly increased in TD as compared to control NSCs. In differentiated conditions, TD cells highly produced GFAP-positive radial glial cells rather than Tuj1- and doublecortin-positive immature neurons as compared to control cells, under both 2D cell culture and 3D cerebral organoids. The CAGE analyses provided altered expressions of cellular signalling-related genes and brain development-related genes in TD cells, which might unveil the signalling mechanisms of TD-phenotypes.

研究分野：発生神経生物学、神経病理学

キーワード：先天異常学 神経幹細胞 難治性脳形成異常 脳オルガノイド FGFR3

1. 研究開始当初の背景

我々は胎児期に脳形成異常と診断され、在胎20週前後で病理解剖を施行した胎児脳について、病理学的解析ならびに遺伝子検索を行ってきた。症例には、脳分離障害、神経細胞移動異常、神経細胞増殖異常、水頭症などが含まれた。これらの中には、胎児期画像診断により遺伝子異常・染色体異常が明らかになり、詳細な病理組織学的検索に至った症例がみられた一方、脳形成異常の病理学的診断が明らかになっても、依然として病因が不明な例が残されている。これまでの検討を総括すると、胎児画像診断・遺伝子診断で確定診断に至らなかった症例の中に、大脳における分化方向の明らかでない細胞の増殖を伴う神経細胞移動異常の症例が多くみられたので、脳発達異常の正確な神経病理学的解析を基盤に置きつつ、分子レベルでのメカニズムの解明を進める必要があると考えた。

2. 研究の目的

我々はインフォームドコンセントの下、病理解剖を行った胎児の大脳皮質から神経幹細胞(NSCs)を樹立してきた。なかでもタナトフォリック骨異形成症(TD)は *FGFR3* 遺伝子の点変異を起因とする脳形成異常を呈するが、受容体以下のシグナル伝達異常とダイナミックな病態形成との連関の詳細なメカニズムは不明であるため、本研究では、神経細胞移動異常、神経細胞増殖異常症例に重点を置き、患者脳から樹立した NSCs を用いて *in vitro* の系ではあるが3次元構造を有したミニブレインモデル(オルガノイド)を構築し、病態不明の脳形成異常のメカニズムの解明を行うことを企図した。

3. 研究の方法

胎児脳からの NSCs の樹立とその培養法の確立は研究分担者の金村が行った。TD由来 NSCs の培養下での特性を調べるために、人工中絶胎児脳由来の NSCs を対照とした比較実験を行った。

(1) NSCs 未分化培養時の細胞増殖能を NSCs スフェア直径の経時的变化率で計測した。未分化培養時の幹細胞マーカおよびラジアルグリアマーカ、細胞増殖マーカ、シグナル経路活性化状態を免疫組織化学、ウェスタン法と qPCR 法で検討した。

(2) 細胞移動能計測はマトリゲルに包埋した NSCs スフェアからの細胞の側方拡散距離を計測することで検討した。

(3) NSCs 分化能はラミニン基質をコートした2次元培養皿にて分散培養し、ニューロンとグリアのマーカの免疫染色を施すことで検討した。また、この分化系において網羅的遺伝子発現解析を行った。

(4) NSCs 由来の大脳様構造体(オルガノイド)を *in vitro* で作製する方法を確立すべく培養液組成、容器形状、細胞外基質の有無、攪拌培養機器の種類などを検討した。正常由

来 NSCs および TD 由来 NSCs からオルガノイドのプロトタイプを作製し、その産物を免疫染色と網羅的遺伝子発現解析によって病態解析を行った。

4. 研究成果

(1) NSCs は bFGF と EGF の存在下にてスフェア状態で維持培養した。スフェア直径の経時的变化率を指標に NSCs 増殖能を比較した実験系では、*FGFR3* 遺伝子に点変異を有する TD 由来 NSCs は正常由来 NSCs と同等の増殖能を示した(図1)。しかし、*in vivo* の脳室帯における神経幹細胞の増殖は、上衣細胞との相互作用・縫線核からのセロトニン入力・黒質からのドーパミン入力・脳室下帯のコリン作動性ニューロンによるアセチルコリン入力などにより時空間的に制御されており、特定の増殖因子を十分に与えた実験環境下で得られた今回の結果が *in vivo* の増殖プロファイルを反映しているかはさらなる検討を要する。

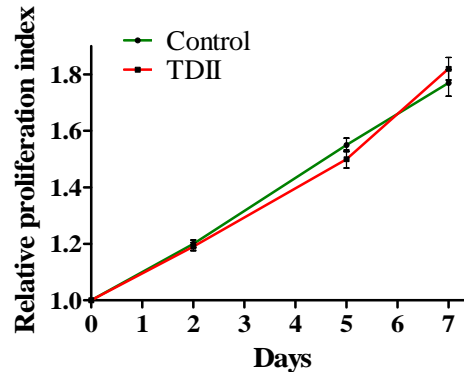


図1. NSCs 増殖能

未分化スフェア状態における細胞マーカ発現プロファイリング解析により、我々が用いた NSCs の神経幹細胞から放射状グリアにわたる細胞系譜に関する情報が得られた。すなわち、TD 由来 NSCs は正常由来と比較して、幹細胞マーカよりむしろ放射状グリアマーカが発現亢進していた。未分化時の細胞系譜のわずかな違いは、採取時期の違いを反映している可能性は否定できないが、*FGFR3* 変異が神経幹細胞の遺伝子発現プロファイルに変動を及ぼす可能性が示唆された。

(2) NSCs の細胞移動能は、NSCs スフェアをマトリゲルに包埋し、スフェアからの細胞の側方拡散距離を計測することで検討した(図2)。正常由来と TD 由来の間で細胞移動能に有意な差は認められなかったが、スフェアから48時間で側方拡散した細胞の種類は特定されておらず、ヘテロな細胞集団の移動を観察したに過ぎない。よって NSCs の増殖能と移動能に及ぼす *FGFR3* 変異の影響に関する理解には、より詳細な検討を要する。

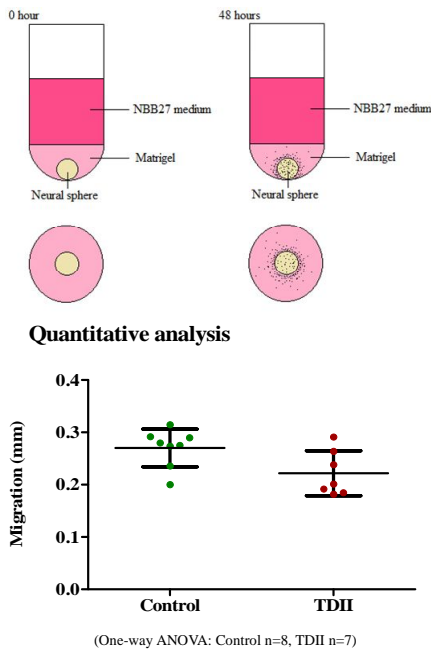


図 2. NSCs の遊走能

(3) ラミニン基質をコートした 2 次元培養皿での分散培養において、TD 由来 NSCs は顕著なグリアへの分化指向性を示した (図 3)。ニューロンおよびグリアの分化比率の変動のみならず分化時の細胞形態の変化も観察され、何らかの機能的異常を反映している可能性が高い。同培養下において施行された網羅的遺伝子発現解析データを用いて、クラスタリング解析とジーンオンロジー解析に供した結果、TD 由来 NSCs と正常由来 NSCs の比較において受容体型チロシンキナーゼ経路関連遺伝子群の変動が見出された。FGFR3 以下のシグナル異常がグリアへの分化亢進に繋がる病態機序を明らかにするには、今回得られた遺伝子発現データのさらなるデータマイニングと検証研究を要する。

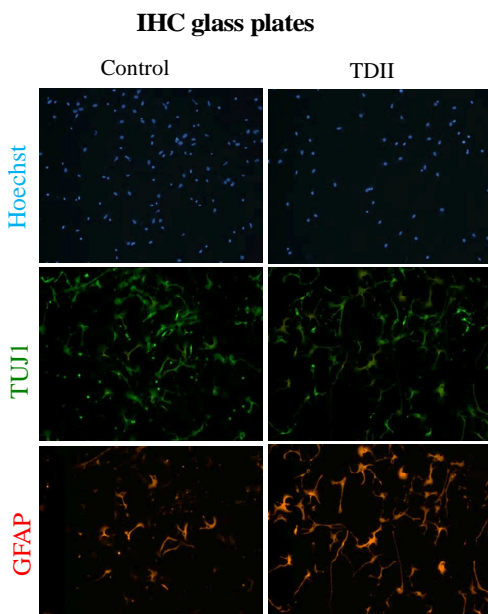


図 3. 2 次元分散培養における細胞分化

(4) NSCs 由来のオルガノイドを *in vitro* で作製すべく 3 年の研究期間にわたり条件検討を継続し、プロトタイプを作製するに至った。切片作製後の免疫染色によって、正常 NSCs オルガノイドと TD オルガノイド間で、分化細胞の分布・細胞数の差異を観察した。両者において、ニューロンとグリアがそれぞれ集積して形成される層構造が存在し、オルガノイドの中央部、中間部、表層部において特徴的なパターン形成が起こった (詳細は今後の論文発表で記載する)。オルガノイドの病態を解析する目的で網羅的遺伝子発現解析を施行し、2 次元分散培養系との共通項のみならず、3 次元オルガノイド特異的に変動する遺伝子群として神経発生関連遺伝子群の存在が観察された。今回のデータはサンプル数 1 の予備的知見であり、また、培養期間が短期間のものに限定されており、病態の十分な理解には今後の発展研究が必要であるが、細胞レベルの知見と遺伝子レベルの知見の連関を明らかにするうえで重要な手掛かりとなり得る。

本研究課題において、ヒト由来神経幹細胞培養を基盤とした *in vitro* 疾患モデルの作製を試みた。世界中で取り組まれている ES 細胞や iPS 細胞を材料にした分化培養、オルガノイド作製法の樹立とは一線を画した研究であり、培養法の確立には予想以上の時間と研究費を要した。開始当初から直面した神経幹細胞の倍化速度や通常フラスコ培養時のスフェア状態の維持の問題などを解決しつつ、前例のない培養法にてオルガノイドのプロトタイプを作製した。培養期間をさらに延長した場合のオルガノイドの変化を検討しつつ、さらなる最適化を図らなければいけない。本研究では TD 病態に特化した、他疾患から樹立した NSCs に関しても本研究で確立された培養法が適用可能と考えられる。複数疾患のオルガノイド表現型を比較検討することで新たに見出される発見と問題点が明確になると期待される。

5. 主な発表論文等

[学会発表](計 2 件)

1 Cristina Nardone, Takahiro Fujimoto, Yoshifumi Miyagi, Yonehiro Kanemura, Shinji Fushiki, Kyoko Itoh

Analyses of human-derived neural stem cell-based organoids as an *in vitro* model of brain anomalies

第 59 回日本小児神経学会学術集会 2017 年 6 月 15-17 日、大阪国際会議場 (大阪府・大阪市)

2 Yoshifumi Miyagi, Yonehiro Kanemura, Takahiro Fujimoto, Shinji Fushiki, Kyoko Itoh

A fetal case of dystroglycanopathy with compound heterozygosity in ISPD gene

第 59 回日本小児神経学会学術集会 2017 年

6月15-17日、大阪国際会議場（大阪府・大阪市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伏木 信次 (FUSHIKI, Shinji)
京都府立医科大学・医学研究科・特任教授
研究者番号：80150572

(2) 研究分担者

伊東 恭子 (ITOH, Kyoko)
京都府立医科大学・医学研究科・教授
研究者番号：80243301

金村 米博 (KANEMURA, Yonehiro)
独立行政法人国立病院機構大阪医療センター
臨床研究センター・再生医療研究室・主任
研究委員
研究者番号：80344175